

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serumparaoxonase (EC 3.1.1.2)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Dr. med. dent. Josef Dumbach
aus Körbeldorf

1976

1977 # 38



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546220_0058

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serumparaoxonase (EC 3.1.1.2)



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Dr. med. dent. Josef Dumbach
aus Körbeldorf

Gedruckt mit der
Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr.Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 23.Dez. 1976

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	4
Einführung in die biochemische Problematik	
2. <u>Problemstellung</u>	16
3. <u>Material</u>	19
3.1. <u>Seren von der Blutbank Erlangen</u>	
3.2. <u>von Studenten, deren Familienangehörigen u.a.</u>	
3.3. <u>von Familien aus verschiedenen Teilen der BRD</u>	
4. <u>Methoden</u>	20
4.1. <u>Photometrischer Test nach Krisch (1968)</u>	
4.2. <u>Anti-CHE-Technik nach Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1969)</u>	
4.2.1. Gewinnung des Serums	
4.2.2. Angewandtes Meßverfahren	
4.2.3. Inkubation mit E 600 (Paraoxon)	
4.2.4. Messung der Cholinesterase-Aktivität	
4.2.5. Überprüfung der Präzision der Anti-CHE-Technik	

	<u>Seite</u>
5. <u>Datenerhebung und -aufbereitung</u>	29
6. <u>Statistische Auswertung</u>	32
6.1. <u>Die Verteilung der Paraoxonase-Aktivität des menschlichen Serums</u>	32
6.2. <u>Zusammenhang zwischen Serumcholinesterase-Ausgangsaktivität und -Restaktivität</u>	34
6.3. <u>Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität</u>	37
6.4. <u>Trennung der Mischverteilung aus den drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität</u>	40
6.5. <u>Einfluß des Alters auf die Gruppenzugehörigkeit der Cholinesterase-Restaktivität</u>	48
6.6. <u>Einfluß des Geschlechts auf die Cholinesterase-Restaktivität</u>	50
6.7. <u>Zusammenhang zwischen Blutgruppen und der Gruppenzugehörigkeit der Cholinesterase-Restaktivität</u>	52
6.8. <u>Gültigkeit der Hardy-Weinberg-Regel für die Verteilung der drei Paraoxonase-typen</u>	54

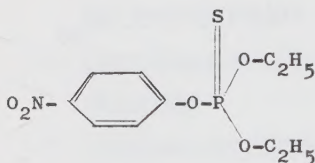
Seite

6.9. <u>Wahrscheinlichkeitsaussagen für den Para-</u>	55
<u>oxonasetyp für individuelle Werte der</u>	
<u>Cholinesterase-Restaktivität</u>	
7. <u>Ergebnisdiskussion</u>	58
8. <u>Zusammenfassung</u>	64
9. <u>Literaturverzeichnis</u>	68

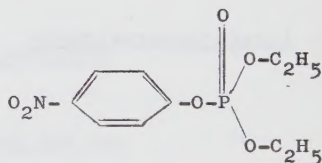
1. Einleitung

Einführung in die biochemische Problematik

E 605 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thionophosphat), zur Reihe der Alkylphosphate gehörend, ist besonders durch seine Verwendung als Schädlingsbekämpfungsmittel bekannt geworden. Im Warmblüterorganismus erfolgt der Austausch des Schwefels gegen Sauerstoff, wodurch Paraoxon, E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) entsteht.



E 605



E 600

Durch im allgemeinen weitgehend irreversible Hemmung der Acetylcholinesterasen (EC 3.1.1.7 bzw. 3.1.1.8) durch E 600 kommt es zu einer Anhäufung von freiem Acetylcholin, welches nicht mehr in das unwirksame Cholin und Essigsäure abgebaut werden kann.

Die Folge ist eine Dauerdepolarisation an den cholinergen Synapsen.

Die Hemmung der Cholinesterasen beruht darauf, daß E 600

an den gleichen Rezeptor wie Acetylcholin tritt und das Enzym durch Phosphorylierung blockiert.

Als Maß der Alkylphosphattoxizität dient in der Literatur häufig die sogenannte I_{50} , welche die molare Konzentration des entsprechenden Hemmstoffs angibt, die nötig ist, um die Cholinesteraseaktivität auf die Hälfte zu erniedrigen.

So fanden Rosival et al. (1959) für menschliches Serum und E 600 eine I_{50} von $0,87 \cdot 10^{-8}$.

Heath (1961) kam für Pferde- und Rattenserum auf Werte von $1,4 \cdot 10^{-7}$ bzw. $2,63 \cdot 10^{-8}$.

Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1969) fanden, daß E 600 in $1,6 \cdot 10^{-7}$ molarer Konzentration zunächst in allen Fällen zur völligen Vergiftung der Acetylcholin-spaltenden Enzyme des menschlichen Serums führt (Messung in der Warburg-Apparatur nach der Methode von Friedberg und Sakai (1958)).

Daraufhin wurde die E 600 Konzentration auf $3,2 \cdot 10^{-8}$ gesenkt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei 37°C . Jetzt ergaben die Messungen der Cholinesterase-Aktivität von menschlichen Seren nicht verwandter Personen unterschiedlich hohe Restaktivitäten, wobei eine Aufteilung der Serumcholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, in eine niedrige, eine mittlere und

eine hohe Gruppe möglich war (s. Tabelle 1).

Tabelle 1

Serumcholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität von 192 menschlichen Seren nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$). (Anti-CHE-Technik, Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1973)

n	Gruppe	Cholinesterase-Restaktivität	
		gemessene Werte	mittlere Restaktivität mit Standardabweichung
128	I	0,0- 6,0	$2,5 \pm 1,1$
46	II	12,0-22,0	$17,2 \pm 2,2$
18	III	30,0-50,0	$39,6 \pm 5,1$

Krisch (1968) untersuchte die enzymatische Aktivität (Paraoxonase, EC 3.1.1.2) von menschlichem Serum gegen E 600. Er maß die Extinktion des durch Hydrolyse freigesetzten p-Nitrophenol unter Anwendung eines photometrischen Testes

bei einer Wellenlänge von 405 nm, einem pH-Wert von 11,2 und einer Temperatur von 25,3 °C.

Hinsichtlich der Paraoxonase-Aktivität unterschied er zwei sich überlagernde Gruppen von Normalpersonen. Allerdings konnte er im Einzelfall wegen des großen Überlagerungsreiches der beiden Aktivitätsgruppen nicht immer eine eindeutige Zuordnung einzelner Personen zu einer der beiden Gruppen angeben.

Die Frage war, ob diese Unterschiede in der Aktivität auf rein quantitative Differenzen des gleichen Enzymproteins oder auf zwei qualitativ verschiedene Enzymproteine zurückzuführen seien.

Krisch (1968) fand bei den Versuchspersonen mit hohen und niedrigen Aktivitäten innerhalb der Fehlerbreite gleiche Michaelis-Konstanten ($K_m = 2,5 - 5,7 \cdot 10^{-4}$ mol/l), d.h. gleiche Affinität zwischen Enzym und Substrat.

Schon Krisch (1968) zog die Möglichkeit in Betracht, daß die Aktivitätsunterschiede zwischen beiden Gruppen genetisch bedingt seien.

Es galt nun festzustellen, inwieweit die unterschiedliche Cholinesterase-Restaktivität (ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität), nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}$ M) und ihre gefundene Verteilung mit der jeweiligen Paraoxonase-Aktivität zusammenhing.

Bei Untersuchungen an 50 Versuchspersonen fanden Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1972) eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) und der Aktivität der E 600-spaltenden Paraoxonase, gemessen nach Krisch (1968). Es zeigte sich dabei, daß sich bei hoher Paraoxonase-Aktivität auch eine hohe Cholinesterase-Restaktivität ergab.

Für die aus beiden Verfahrensweisen stammenden Versuchsergebnisse ließ sich, ungeachtet der unterschiedlichen Bedingungen (z.B. pH-Wert, Pufferzusammensetzung, Temperatur, Meßzeit, Paraoxonkonzentration), ein Korrelationskoeffizient von $r = +0,82$ ermitteln, der die Korrelation hochsignifikant sichert ($t = 9,6$, s. Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1972).

Die Unterschiede in der Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) sind demnach wohl auf unterschiedliche Serumparaoxonase-Aktivitäten zurückzuführen. Das bedeutete, daß unterschiedliche Restaktivitäten der Cholinesterase als empfindliches Indikatorsystem für die verbleibende E 600-Konzentration und damit für die jeweilige Paraoxonase-Aktivität herangezogen werden können.

Der genannte Korrelationskoeffizient wurde aufgrund einer

als linear angenommenen Beziehung zwischen Paraoxonase-aktivität (U/ml) und Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}$ M) errechnet. Die Korrelation zwischen dem negativen Logarithmus der Paraoxonkonzentration und einer sich ergebenden Cholinesterasehemmung, jeweils ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, zeigt jedoch einen S-förmig gebogenen Verlauf. Daraus folgt, daß die Beziehung zwischen der Paraoxonase-Aktivität und der Serumcholinesterase-Restaktivität nicht linear sein kann (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1972). Die tatsächliche Abhängigkeit zwischen den beiden Variablen ist noch weit größer.

Mit ähnlicher Problematik (Problem der äquivalenten Differenzen) hat sich Koller (1955) befaßt.

Trotzdem muß daran gedacht werden, daß unter Umständen auch andere unspezifische Serumesterasen an der Abspaltung von p-Nitrophenol aus Paraoxon mitbeteiligt sind. So wird z.B. bei der Reaktion der Cholinesterase mit Paraoxon zwar der Phosphatrest sehr stark an das Enzym gebunden, der Paranitrophenolanteil jedoch freigesetzt.

Die Cholinesterase-Aktivität menschlicher Seren weist starke individuelle Unterschiede auf.

Untersuchungen von Schwarzfischer (1975) an 156 Versuchspersonen zu einer möglichen Korrelation der Cholinesterase-Ausgangsaktivität des menschlichen Serums und der Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), ergaben nach Auswertung der Versuchsergebnisse mit Hilfe einer Korrelationsberechnung einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,1157$. Es ist deshalb nicht anzunehmen, daß ein wesentlicher Zusammenhang besteht und die Ausgangsaktivität der Serumcholinesterase einen Einfluß auf die Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) hat.

Aldridge (1953a) hatte schon früher im Serum verschiedener Tierarten und des Menschen ein Paraoxon-spaltendes Enzym, die Paraoxonase, gefunden, das nach seinen Untersuchungen der sogenannten A-Esterase (Arylesterase) gleichzusetzen ist. Die sogenannte B-Esterase (Carboxylesterase) wurde durch E 600 inaktiviert.

In einer späteren Untersuchung fand Aldridge (1953b) dann ein Paraoxon-hydrolysierendes Enzym, das sich als identisch mit der bereits bekannten A-Esterase erwies.

Zur Klärung der Natur dieser Serumarylesterase (EC 3.1.1.2) wurde weitere umfangreiche Forschungsarbeit geleistet, ins-

besondere von Augustinsson und Heimbürger (1954a, 1954b, 1955), Mounter (1954), Friedberg und Erdmann (1959), sowie von Schaumann und Schiller (1960). Diese Autoren kommen zu dem Ergebnis, daß Nativseren wahrscheinlich ein Enzym mit bevorzugt E 600-spaltender Aktivität besitzen.

Main (1960) unternahm den Versuch, das E 600-hydrolysierende Enzym des Schafserums möglichst rein darzustellen.

Durch 350 - 385 fache Anreicherung gewann er ein nach dem Ergebnis elektrophoretischer Untersuchungen 80 - 95 % ig reines Enzympräparat.

Das Molekulargewicht der Schaf-Paraoxonase lag zwischen 35000 - 50000.

Nach Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1973) ist die menschliche Serumparaoxonase ein Enzym mit hoher Substratspezifität, das schon auf geringe Veränderungen am Substratmolekül reagiert.

Zech und Zürcher (1974) untersuchten neben der Kinetik der Serumparaoxonase (Arylesterase, EC 3.1.1.2, von ihnen Phosphorylphosphatase genannt) die Aktivitätsverteilung, unter anderem an 619 Versuchspersonen zwischen 4 und 78 Jahren.

Die Serumphosphorylphosphatase-Aktivität wurde über die Extinktion des aus Paraoxon freigesetzten p-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 400 nm nach einer spektrophotometrischen Methode bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 25 °C gemessen. Die getesteten Seren zeigten Michaeliskinetik ($K_m = 7 \cdot 10^{-4}$ mol/l).

Während die individuelle Aktivität im Kaninchenserum eine normale Verteilungskurve ergab, fanden Zech und Zürcher (1974) beim Menschen die in Abb. 1 (schwarze Säulen) wiedergegebene Verteilung. Sie nehmen eine bimodale Verteilung an.

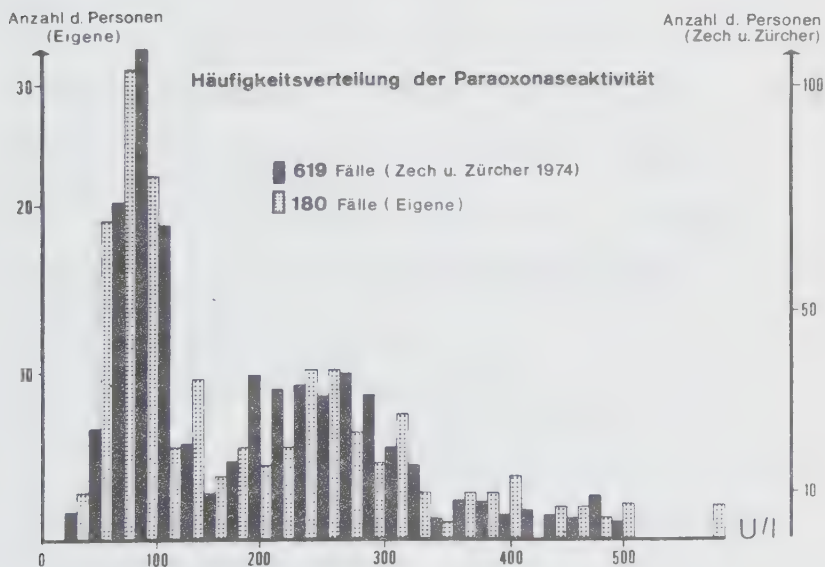
Es zeigten sich keine signifikanten Geschlechtsunterschiede. Bei Personen über 50 Jahren war der erste Peak der Verteilungskurve etwas höher als bei der jüngeren Personengruppe. Die durchschnittliche Phosphorylphosphatase-Aktivität von älteren Personen war niedriger.

Beide Enzymaktivitäten hatten aber identische Verteilungskoeffizienten bei der Gel Chromatographie mit Sephadex G-200.

Die Autoren errechneten ein Molekulargewicht von ca. 500000. Die "Phosphorylphosphatase"-Aktivität im Serum von je zwei Personen aus der Gruppe mit niedriger und der Gruppe mit

Abbildung 1

Häufigkeitsverteilung der Paraoxonase-Aktivität nach Untersuchungen von Zech und Zürcher (1974) und nach Untersuchungen im Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg.



hoher Aktivität war über einen Zeitraum von 4 Wochen konstant.

Untersuchungen von Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1973) an 35 Familien mit 52 Kindern mittels der Anti-CHE-Technik ergaben, daß der festgestellte Polymorphismus der menschlichen Serumparaoxonase möglicherweise genetisch determiniert ist und einem einfachen Zwei-Allele-Modell folgt. Obwohl zur Zeit noch ungeklärt ist, ob die Aktivitätsunterschiede durch quantitative Unterschiede des gleichen Enzymproteins oder durch das Vorliegen verschiedener Enzymproteine bedingt sind und bei etwaigen qualitativen Unterschieden über die jeweilige elektrophoretische Beweglichkeit noch keine Aussage gemacht werden kann (s. IUPAC-IUB-Empfehlungen, 1971), wählten Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1973) zur einfachen Darstellung ihrer Ergebnisse die folgenden Bezeichnungen (Tabelle 2, s. Seite 14).

Die Ergebnisse der Familienuntersuchungen sind in Tabelle 3 (s. Seite 15) wiedergegeben. Sie widersprechen in keinem Fall dem angenommenen Modell und machen es wahrscheinlich, daß der Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase genetisch determiniert ist.

Tabelle 2

Gewählte Bezeichnung für die Paraoxonasetypen

Serumcholin- esterase- Restaktivität (Anti-CHE- Technik)	Serum- Paraoxonase- Aktivität	Paraoxonasetyp	
		früherer Name	neuer Name
niedrig	niedrig	Gruppe I	1 - 1
mittel	mittel	Gruppe II	2 - 1
hoch	hoch	Gruppe III	2 - 2

Tabelle 3

Serum-Paraoxonase-Typen bei 35 Familien mit 52 Kindern
(Anti-CHE-Technik)

Eltern		Kinder		
Paarungen	Familien	Typ		
		1 - 1	2 - 1	2 - 2
	n	n	n	n
1 - 1x1 - 1	12	13	-	-
1 - 1x2 - 1	11	9	8	-
1 - 1x2 - 2	2	-	3	-
2 - 1x2 - 1	4	3	3	1
2 - 1x2 - 2	4	-	5	4
2 - 2x2 - 2	2	-	-	3
	35	25	19	8

2. Problemstellung

Im Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg waren in den letzten Jahren Seren von 601 Einzelpersonen und von 99 Familien mit insgesamt 180 Kindern nach der Anti-CHE-Technik (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1969) untersucht worden.

Weitere 180 Seren von Einzelpersonen waren nach der Methode von Krisch (1968) untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Ergebnisse dieser Untersuchungen statistisch ausgewertet werden.

Folgende Fragen sollten untersucht werden:

- a) Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1972) fanden eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Serumcholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}$ M) und der Aktivität der E 600-spaltenden Serum-Paraoxonase, gemessen nach Krisch (1968). Damit kann die Paraoxonase-Aktivität auch über unterschiedliche Restaktivitäten der Cholinesterase als empfindliches Indikatorsystem für die jeweilige Paraoxonase-Aktivität bestimmt werden.

Mit der Anti-CHE-Technik (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1969) war eine Aufteilung der Cholinesterase-Rest-

aktivität von 192 menschlichen Seren in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Aktivität möglich. In einem gewissen Widerspruch dazu steht, daß Krisch (1968) bei 50 Seren und Zech und Zürcher (1974) bei 619 Seren nach der direkten spektrophotometrischen Methode eine Aufteilung der Paraoxonase-Aktivität in zwei Gruppen annehmen.

Es erhebt sich somit die Frage, ob es sich um zwei oder um drei Gruppen verschieden hoher Paraoxonase-Aktivität handelt, wenn deren Aktivität nach Krisch (1968) gemessen wird.

- b) Besteht eine Abhängigkeit von Serumcholinesterase-Ausgangs- und Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$)?
- c) Wie sind die drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) als Ausdruck der Paraoxonase-Aktivität und damit die drei Paraoxonasetypen in der Bevölkerung verteilt?
- d) Ist es möglich, die Mischverteilung aus den drei Gruppen zu trennen?

- e) Ist die Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraaxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) und damit die Paraaxonase-Aktivität vom Alter abhängig?
- f) Ist die Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraaxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) und damit der Paraaxonasetypus mit dem Geschlecht genetisch gekoppelt?
- g) Ist die Verteilung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraaxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) und damit die Verteilungen der Paraaxonasetypen bei den Blutgruppen des ABO-Systems oder des Dd-Systems verschieden?
- h) Stimmt die Verteilung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraaxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) und damit der drei Paraaxonasetypen mit der Hardy-Weinberg-Regel überein?

3. Material

Das Untersuchungsmaterial besteht aus Seren von 601 Einzelpersonen und von 99 Familien mit insgesamt 180 Kindern, die nach der Anti-CHE-Technik (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1969) untersucht worden waren.

Weitere 180 Seren von Einzelpersonen waren nach der Methode von Krisch (1968) untersucht worden.

Bei den Einzelpersonen handelte es sich um Blutspender der Blutbank Erlangen, die Untersucher und deren nicht blutsverwandte Angehörige, sowie Freunde und Kollegen.

Die Familien stammen aus verschiedenen Teilen der Bundesrepublik.

Für die vorliegende Untersuchung fanden frühere Versuchsergebnisse von Aichinger (1976), Bartel, Baumgartner (1970), Behringer, Braunmiller (1975), Burgis (1972), Dietrich, Dietzel (1974), Eckstein, Fischer (1975), Flügel, Gebhard, Göbel, Hiller (1975), v.Horn (1975), Marquart (1973), Megerle (1975), Metzner (1973), Müller (1975), Nierschl (1972), Ortlieb, Pechmann (1976), Renner (1973), Riemann, Schmitt (1975), Schramm, Schwarzfischer (1975), Stephan (1973), Westernacher (1975), Zimmer (1975) aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg Verwendung.

4. Methoden

Zur Feststellung der Paraoxonase-Aktivität des menschlichen Serums wurden zwei verschiedene Meßmethoden angewandt:

- a) Die spektrophotometrische Methode, mit der nach Krisch (1968) das aus Paraoxon ($c = 10^{-4}$ molar) bei einem pH-Wert von 11,2 abgespaltene p-Nitrophenol gemessen wird.
- b) Die Anti-CHE-Technik (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1969), wobei die Paraoxonase-Aktivität in der Warburg-Apparatur durch die Feststellung der Serumcholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}$ M) ermittelt wird.

4.1.

Photometrischer Test nach Krisch (1968)

In einem selbstregistrierenden Spektralphotometer (Modell DK 2 der Firma Beckman Instruments) wurde bei der Wellenlänge 405 nm die Extinktion der durch enzymatische Hydrolyse bei pH 11,2 und 25 °C freigesetzten Menge an p-Nitrophenol gemessen.

Die verwendeten Lösungen entsprachen praktisch der Vorschrift des Standardtests von Krisch (1968):

0,1 M Glycin-Natronlauge-Puffer pH 11,2.

E 600 Stammlösung: $1,2 \cdot 10^{-2}$ M E 600 in 0,1 M

Trispuffer pH 9,0. Die Stammlösung wurde zum Gebrauch 1 : 5 mit dest. Wasser verdünnt.

Serum, 1: 5 mit 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt.

Die große Wirkungsbreite des 0,1 M Glycin-NaOH-Puffers, ermöglichte die Ausschaltung eines pufferbedingten Störfaktors.

Es erwies sich im Meßverfahren als sehr vorteilhaft, das Puffergemisch von der umgebenden Luft (insbesondere der Atemluft beim Pipettieren) möglichst fernzuhalten, um ein Absinken des pH-Wertes im Verlauf der Messung zu vermeiden.

Der Meßansatz war wie folgt zusammengesetzt:

In ein Reagenzglas wurden pipettiert:

1,65 ml Puffer (pH 11,2)

+0,50 ml E 600-Lösung

+0,25 ml 1:5 verdünntes Serum

Sofort nach Zugabe des Serums wurde die Lösung in eine Küvette gefüllt.

In Abständen von jeweils 30 sec. und über einen Zeitraum von 150 sec. wurde die Extinktion registriert. Zur Auswertung jedoch kam nur die Extinktionsdifferenz von 150 minus 30 sec., abzüglich der Extinktionsdifferenz des Leerwertes (E 600-Hydrolyse im gleichen Milieu ohne Serum), über zwei Minuten (4E).

Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in Mol abgespaltenes p-Nitrophenol wurde der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glycin-NaOH-Puffer, pH 11,2)

$$\epsilon_{405 \text{ nm}} = 18,05 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$$

zugrundegelegt.

10 μMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten danach (bei $d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 405 \text{ nm}$) eine Extinktion von 0,1805. Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf ml Serum durch Multiplikation mit 20), der Meßzeit (Umrechnung auf eine Min. durch Division durch 2) und des Ansatzvolumens (2,4 ml; Multiplikation mit 2,4) errechnet sich die Aktivität (in $\mu\text{Mol} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ Serum) nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \cdot 10 \cdot 2,4 \cdot 20}{0,1805 \cdot 2} = E \cdot 1330 \text{ (U/1 Serum)}$$

4.2.

Anti-CHE-Technik (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1969)

Die Messung der Serumcholinesterase-Aktivität erfolgte mit Butyrylcholinjodid als Substrat in der Warburg-Apparatur mittels der Methode von Friedberg und Sakai (1958).

Butyrylcholinjodid ist ein spezifisches Substrat, das sehr schnell von der (Pseudo-) Cholinesterase des Serums (EC 3.1.1.8) abgebaut wird, nicht jedoch von der Acetylcholinesterase der Erythrocyten (EC 3.1.1.7). Aktivitäten anderer Enzyme, vor allem die der Acetylcholinesterase, werden damit ausgeschlossen, wodurch spezifische enzymatische Tests im Serum ermöglicht werden.

Besonders deutlich wird der Vorteil der Verwendung von Butyrylcholin gegenüber dem häufig verwendeten Acetylcholin, wenn es bei der Blutentnahme oder durch zu langes Stehen des Blutes zur Hämolyse gekommen ist, sodaß ein Übertritt der Acetylcholinesterase aus den Erythrozyten ins Serum stattfinden konnte. Außerdem beträgt bei dieser

Methodik bei gleicher Serummenge die CO_2 -Entwicklung mehr als das Doppelte als bei Einsatz von Acetylcholinchlorid, und somit kann die Meßdauer verkürzt werden.

4.2.1.

Gewinnung des Serums

Mit einer Venüle wurde 10 ml Blut entnommen und etwa 30 Minuten nach Entnahme 15 Minuten lang bei 1600 U/min zentrifugiert, wobei das überstehende Serum nicht hämolysieren durfte. Das gewonnene Serum wurde sofort abgetrennt, die Messungen spätestens nach 2 Tagen durchgeführt.

4.2.2.

Angewandtes Meßverfahren

Die Serumcholinesterase-Aktivität wurde in einer Warburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, nach der manometrischen Methode von Ammon (1934), modifiziert nach Friedberg und Sakai (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2 bestimmt.

Die Bedingungen der Inkubation mit E 600 wurden auf die nachfolgende Aktivitätsmessung abgestimmt.

4.2.3.

Inkubation mit E 600 (Paraaxon)

Zur Herstellung der Giftlösung wurde mittels einer geeichten Mikropipette 1 μ l E 600 auf 90 ml destilliertes Wasser gegeben und etwa 8 Minuten lang gut im Erlenmeyerkolben geschüttelt.

10 μ l dieser Lösung wurden mit 13,5 ml Verdünnungslösung wiederum 8 Minuten lang gut vermischt.

Die Verdünnungslösung setzte sich aus 10 Teilen einer 0,9 %igen Natriumchloridlösung und drei Teilen einer 1,26 %igen Natriumhydrogenkarbonatlösung zusammen.

Zur Vergiftung wurden 0,15 ml Serum mit 1,35 ml der E 600-haltigen Verdünnungslösung verdünnt, sodaß die E 600-Konzentration im Inkubationsansatz $c = 3,2 \cdot 10^{-8}$ molar war.

Von den Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes pipettiert, das im Hauptraum 1,5 ml einer 0,546 %igen wässrigen Lösung von Butyrylcholinjodid enthielt.

Die Warburggefäße wurden dann auf Manometer aufgesteckt und in ein Wasserbad von 37 °C gebracht. Dabei wurden alle Manometer mit einem Gemisch aus 5 % CO₂ und 95 % N₂ 20 Minuten lang begast.

Die Gesamtinkubationszeit betrug 60 Minuten, der pH-Wert lag bei etwa 7,7 (Süllmann, 1964).

4.2.4.

Messung der Cholinesterase-Aktivität

Nach Beendigung der Inkubation wurde die Serumverdünnung aus den Anhangsbirnen in den Hauptraum der Warburggefäße gekippt. Der pH-Wert sank daraufhin auf 7,2 (Süllmann, 1964). Bei noch geöffneten Manometerhähnen wurde drei Minuten lang mit einer Frequenz von 100/min geschüttelt und anschließend die Manometerhähne geschlossen.

Nach 15 und 30 Minuten wurde der Manometerstand notiert. Die Seren wurden in Doppelbestimmungen mit und ohne E 600 auf ihre Restaktivität getestet.

Zur Kontrolle wurden bei jedem Versuch zwei Leerwerte mitgeführt. Dabei enthielt die Anhangsbirne des Warburgkölbchens nur Verdünnungslösung, sodaß die Eigenhydrolyse des Substrates erfaßt werden konnte.

In zwei Versuchsabläufen wurden drei Seren mit insgesamt vier Leerwerten, vier Ansätzen mit und vier Ansätzen ohne Paraoxon auf ihre Restaktivität geprüft.

Die 30 min-Werte der Ansatz-Messung wurden jeweils mit den entsprechenden Manometerkonstanten (Süllmann, 1964)

multipliziert und das arithmetische Mittel errechnet. Ebenso wurden die beiden Leerwerte berechnet und der Mittelwert aus beiden vom obigen Wert subtrahiert. Im zweiten Versuchsablauf wurde genauso verfahren und aus den Versuchsergebnissen erneut das arithmetische Mittel gebildet. Die Aktivität wird in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$, bezogen auf 0,15 ml Serum, angegeben.

4.2.5.

Präzision der Anti-CHE-Technik

Ortlieb führte im Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg für drei Seren mit niedriger, mittlerer und hoher Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) je 25 Messungen der Cholinesterase-Restaktivität nach der Anti-CHE-Technik (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1969) durch.

In Tabelle 4 (s.S. 28) sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und 5 %-Konfidenzbereiche aus den 25 Messungen für jedes der drei Seren angegeben.

Tabelle 4

Mittelwerte, Standardabweichungen und 5 %-Konfidenzbereiche der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, aus je 25 Messungen für drei Seren mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraaxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$). (Anti-CHE-Technik nach Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1969). (Festlegung der Bezeichnung s. Tabelle 2, S. 14).

Paraoxonase-	1 - 1	2 - 1	2 - 2
typ			
Mittelwert	1,60	9,93	66,61
Standard-	1,01	2,29	4,79
abweichung			
5 %-Konfidenz-	[1,17; 2,01]	[8,97; 10,87]	[64,63; 68,59]
bereiche			

5. Datenerhebung und -aufbereitung

Die Probanden für die im Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführten Untersuchungen waren eine Zufallsauswahl aus Blutspendern der Blutbank Erlangen, Studenten, den Untersuchern und ihren Angehörigen. Die untersuchten Familien stammen aus verschiedenen Teilen der Bundesrepublik.

Es handelte sich in allen Fällen um gesunde, nicht blutsverwandte Personen, die zum Zeitpunkt der Untersuchungen wissentlich an keinen Erkrankungen litten, insbesondere nicht an Leberkrankheiten und an Diabetes mellitus.

Die Angaben zum Alter, zu den Blutgruppen und zur Ausgangsaktivität der Cholinesterase sind für einen Teil der 601 Einzelpersonen nicht vollständig.

In 301 Fällen waren von der Blutbank Erlangen die Blutgruppen bestimmt worden. Nur diese wurden hier verwendet. Um zufällige Blutsverwandschaft zwischen zwei Probanden weitgehend auszuschließen, wurden bei den Einzelpersonen keine Versuchspersonen mit gleichen Nachnamen für die Untersuchungen herangezogen. Von den Eltern (Vater und Mutter) aus den Familienuntersuchungen wurde angenommen, daß sie nicht blutsverwandt sind. Deren Kinder wurden bei der

statistischen Auswertung der Daten nicht blutsverwandter Einzelpersonen nicht berücksichtigt.

Wenn Zweifel an der Richtigkeit von Versuchsergebnissen aufkamen, z.B. weil die Werte im Grenzbereich der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$) lagen, wurde die Blutentnahme wiederholt und alle Untersuchungen wurden ein zweites Mal durchgeführt.

Bei der Untersuchung der Seren einiger Familien war die bei den Kindern festgestellte Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$) und damit der Paraoxonasetyp nicht ohne weiteres nach dem von uns angenommenen Erbgang von der Gruppenzugehörigkeit der Cholinesterase-Restaktivität der Eltern abzuleiten. In diesen Fällen wurden umfangreiche serologische Untersuchungen durchgeführt.

Es war aber in keinem Fall ein Vaterschaftsausschluß möglich. Die Mutter-Kind-Paarung ist in diesem Zusammenhang als besonders sicher anzusehen.

Damit gaben die Ergebnisse dieser Familienuntersuchungen bereits einen Hinweis auf die Überschneidung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), (Ortlieb).

6. Statistische Auswertung

Über die Probanden wurde eine Kartei mit Vor- und Zuname in alphabetischer Reihenfolge und mit durchlaufender Nummerierung angelegt.

Folgende Angaben fanden, soweit sie bekannt waren, Aufnahme in die Kartei: Alter, Geschlecht, Blutgruppen des ABO- und des Dd-Systems, Serumcholinesterase-Ausgangsaktivität und Serumcholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$).

Die Versuchsergebnisse und Daten wurden verschlüsselt und auf Lochkarten übertragen.

Die rechnerische Auswertung wurde auf der Rechenmaschine CDC 330 des Rechenzentrums der Universität Erlangen-Nürnberg, teilweise unter Verwendung der Computerprogramme der Statsys-Programmbibliothek (Victor et al., 1973) durchgeführt.

6.1.

Die Verteilung der Paraoxonase-Aktivität des menschlichen Serums

Krisch (1968) untersuchte die enzymatische Aktivität von menschlichem Serum gegen E 600 an 50 Probanden.

Hinsichtlich der Paraoxonase-Aktivität unterschied er zwei sich überlagernde Gruppen von Normalpersonen. Krisch hatte allerdings bei der Untersuchung einiger Probanden auch höhere Aktivitäten festgestellt, die einer dritten hohen Gruppe der Paraoxonase-Aktivität entsprechen. Diese Probanden sind nicht unter den 50, die vorher erwähnt wurden.

Zech und Zürcher (1974) fanden die in Abb. 1 (S. 12, schwarze Säulen) dargestellte Verteilung der Paraoxonase-Aktivität von 619 untersuchten Probanden. Sie nehmen eine Aufteilung in 2 Gruppen an.

Baumgartner (1970), Burgis (1972), Dietzel (1974), Flügel, Metzner (1973), Nirschl (1972) und Renner (1973) machten im Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg Untersuchungen über die Paraoxonase-Aktivität an 180 Probanden nach der direkten spektrophotometrischen Methode von Krisch (1968). Bei der Auswertung ihrer Versuchsergebnisse (Abb. 1, S. 12, weiße Säulen) fanden wir weitgehend die gleiche Verteilung wie Zech und Zürcher (1974).

Das optische Bild dieser Verteilungen (Abb. 1, S. 12)

spricht aber im Gegensatz zu der Annahme von Zech und Zürcher (1974) unserer Ansicht nach dafür, daß eine Mischverteilung aus drei Normalverteilungen vorliegt, wobei die dritte Aktivitätsgruppe etwa bei $430 \mu\text{Mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ beginnt.

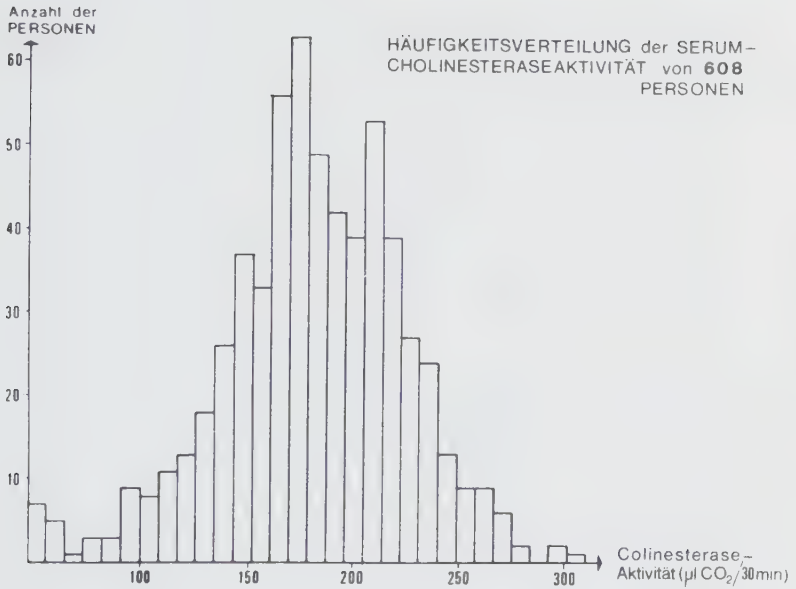
Damit besteht kein Gegensatz mehr zu der Annahme von Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1973), die aufgrund ihrer Ergebnisse mit der Anti-CHE-Technik und aufgrund von Familienuntersuchungen vermuteten, daß es sich um eine Mischverteilung aus drei Verteilungen handele und daß drei Paraoxonasetypen vorliegen müßten, die genetisch determiniert sind und einem einfachen Zwei-Allele-Modell folgen.

6.2.

Zusammenhang zwischen Seruncholinesterase-Ausgangsaktivität und -Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$)

Der optische Eindruck des Histogramms (Abb. 2) der Cholinesterase-Ausgangsaktivität von 608 Personen läßt auf Normalverteilung schließen.

Abbildung 2



Schon beim Vergleich mit der Verteilung der Cholin-esterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}\text{M}$) (Abb. 3, S. 38), ist keine Korrelation zwischen Ausgangs- und Restaktivität zu erkennen.

Die einfache lineare Regression für Cholinesterase-Ausgangs- und -Restaktivität ergab bei 608 ausgewerteten Fällen einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,033$.

Das spricht nicht für eine Abhängigkeit. Die Ergebnisse von Schwarzfischer (1975) bestätigten sich hiermit.

Auffällig sind 13 sehr niedrige Werte der Cholinesterase-Ausgangsaktivität, die sich von den übrigen 595 normalverteilten Werten abheben (Abb. 2).

Hierbei kann es sich um genetische Varianten der Serumcholinesterase handeln (vergleiche Goedde et al., 1967). Dagegen spricht aber die relative Häufigkeit dieser Werte.

In Tabelle 5 (s.S. 36) sind diese 13 sehr niedrigen Werte der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und die entsprechenden Werte der Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}\text{M}$), zusammengestellt.

Tabelle 5

13 sehr niedrige Werte der Cholinesterase-Ausgangsaktivität ($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$) und die entsprechenden Werte der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$).

Nr.	Cholinesterase- Ausgangsaktivität	Cholinesterase- Restaktivität
1	45,1	3,8
2	48,9	2,4
3	50,0	5,0
4	50,3	1,4
5	51,0	11,6
6	51,8	2,5
7	51,9	43,2
8	56,7	1,3
9	59,6	18,0
10	61,0	36,1
11	62,3	16,5
12	62,5	14,9
13	69,0	29,3

Aus Tabelle 5 ist keine Abhängigkeit zwischen Cholinesterase-Ausgangs- und -Restaktivität zu erkennen. Unter den Werten niederer Cholinesterase-Ausgangsaktivität finden sich niedere, mittlere und hohe Werte der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$). Wir werden versuchen, der Frage nach dem Vorliegen atypischer Cholinesterasen weiter nachzugehen.

6.3.

Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$)

Die Werte der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) von 601 Einzelpersonen und von den 99 Elternpaaren aus den Familienuntersuchungen, ergaben zusammen 799 Werte.

Das Histogramm dieser 799 Werte (Abb. 3), zeigt eine Mischverteilung aus drei Verteilungen mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesterase-Restaktivität als Ausdruck der drei Paraoxonasetypen.

Die Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1969) mögliche

strenge Trennung der drei Gruppen dürfte durch die geringe Fallzahl zu Beginn der Untersuchungen über die Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$), bedingt gewesen sein.

Das Histogramm (Abb. 3) zeigt aber keine Normalverteilung für die drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität, was damit zu erklären ist, daß die Abhängigkeit zwischen dem negativen Logarithmus der Paraoxonkonzentration und einer sich ergebenden Cholinesterasehemmung, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, einen S-förmig gebogenen Verlauf zeigt.

Daraus folgt, daß die Beziehung zwischen der Paraoxonase-Aktivität und der in dieser Weise ausgedrückten Cholinesterase-Restaktivität nicht linear sein kann.

(Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1972).

Mit ähnlicher Problematik (Problem der äquivalenten Differenzen) hat sich Koller (1955) befaßt.

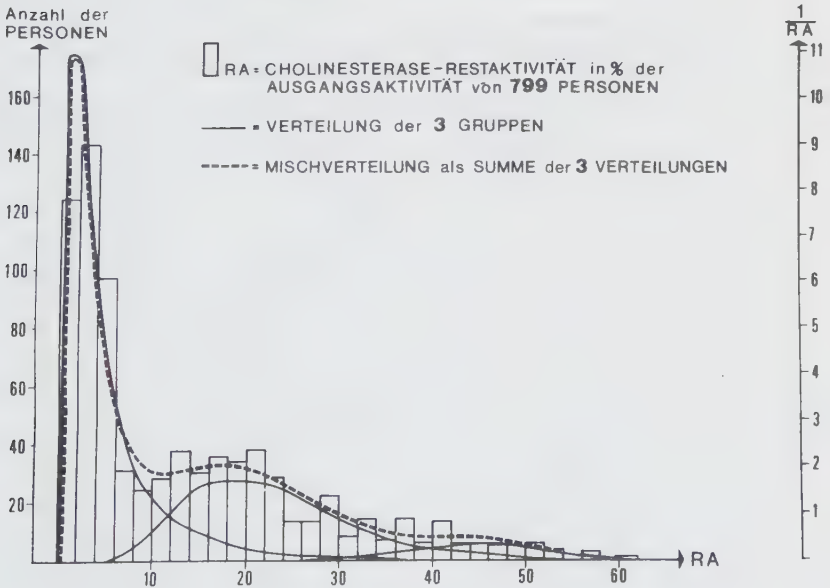
Die Werte der Cholinesterase-Restaktivität wurden deshalb nach Koller (1955) mit $\ln \left(\frac{RA}{1-RA} \right)$ logistisch transformiert.

In dieser Gleichung bedeutet RA: Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$).

Abbildung 3

- a) Häufigkeitsverteilung der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) von 799 nicht blutsverwandten Personen
- b) Verteilung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität
- c) Mischverteilung als Summe dieser drei Verteilungen (genaue Erklärung siehe Text)

RA = Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität

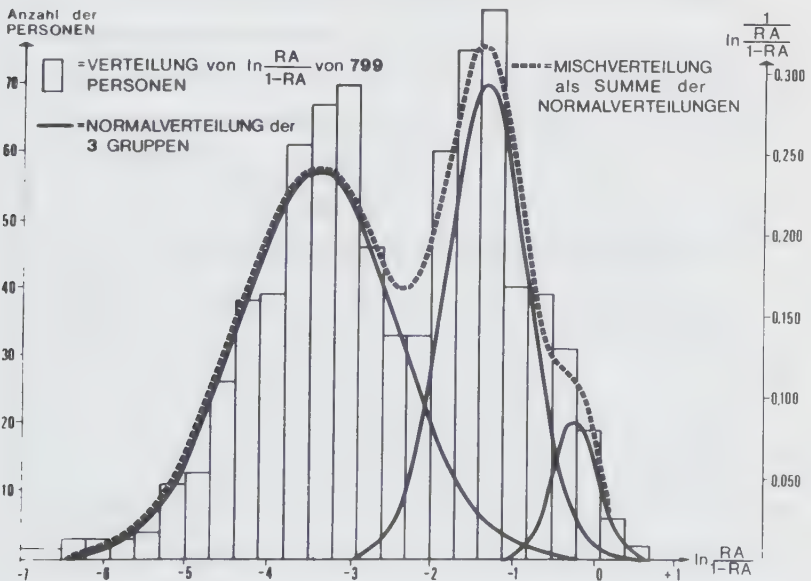


Von den neuen Werten wurde wieder ein Histogramm erstellt (Abb. 4). Jetzt konnten wir Normalverteilung innerhalb jeder der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität annehmen. Wie die Abb. 4 zeigt, sieht das optische Bild eher nach einer Überlagerung dreier Normalverteilungen aus und es ist nicht möglich, die drei Gruppen exakt zu trennen.

Aufgrund des jetzt vorliegenden umfangreichen Untersuchungsgutes, erscheint es sinnvoller, für Werte der Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), in den sich überschneidenden Bereichen zweier benachbarter Gruppen, nur Wahrscheinlichkeitsaussagen bezüglich der Zuordnung eines Wertes zu diesen Gruppen zu machen.

Abbildung 4

- a) Häufigkeitsverteilung der logistisch transformierten Werte der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) von 799 Personen
- b) Normalverteilungen der drei Gruppen
- c) Mischverteilung als Summe dieser Normalverteilungen (genaue Erklärung siehe Text)
- RA = Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}$)



6.4.

Trennung der Mischverteilung aus den drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$)

Für die folgende Untersuchung wurden die Ergebnisse der Einzel- und Familienuntersuchungen zusammengefaßt, obwohl die Repräsentationsgleichheit möglicherweise nicht völlig gewährleistet ist. Dies wurde aber in Kauf genommen, da die Konstellationen der Familienwerte unter der Annahme einer Vererbung der drei Paraoxonase-Typen nach einem einfachen Zwei-Allele-Modell als stochastisches Außenkriterium dienen sollten, während die Einzelwerte die Gestalt der Mischverteilung möglichst genau festlegen sollten. Da das Außenkriterium nicht determiniert, sondern nur durch Wahrscheinlichkeiten gegeben ist, war eine rechnerische Lösung im Sinne der Diskriminanzanalyse nicht möglich. Es wurde ein eher clusteranalytischer Ansatz verwendet und zwar mit Hilfe eines Iterationsverfahrens.

Zunächst wurden die Gruppenhäufigkeiten sowie die Mittelwerte und Varianzen der drei Normalverteilungen grob abgeschätzt. Mit diesen Werten wurden die Wahrscheinlichkeiten, zu einer der drei Gruppen zu gehören, für alle

Einzelprobanden und für die Eltern aus den Familienuntersuchungen - hier unter Berücksichtigung der Restaktivitätswerte der Kinder - bestimmt. Hierauf wurden, lediglich unter Verwendung dieser Wahrscheinlichkeiten sowie der Meßwerte, neue, verbesserte Schätzungen der Häufigkeiten, Mittelwerte und Varianzen ermittelt. Dieses Verfahren wurde so lange fortgesetzt, bis eine ausreichende Konvergenz erzielt war, das heißt, bis sich die Werte beim nächsten Iterationsschritt von den vorherigen Werten fast nicht mehr unterschieden.

Eine exakte mathematische Formulierung wurde von Hommel (1976) an anderer Stelle veröffentlicht.

Am Beispiel der Familie L. soll das Prinzip des Trennungsvorgangs nochmals erläutert werden.

Bei der Untersuchung der Seren nach der Anti-CHE-Technik (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1969), waren folgende Werte der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$), festgestellt worden:

Vater 1,8 %

Mutter 42,9 %

Kind 9,1 %

Der niedrige Wert des Vaters spricht sehr für eine Zuordnung zum Paraoxonasetyp 1 - 1, der hohe Wert der Mutter für eine Zuordnung zum Paraoxonasetyp 2 - 2 (Erklärung der Bezeichnung s. Tabelle 2, S. 14).

Bei isoliertem Vergleich des Wertes des Kindes mit der Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), siehe Abb. 3, S. 38, würde man diesen Wert ebenfalls dem Paraoxonasetyp 1 - 1 zuordnen.

Unter der Annahme einer Vererbung der drei Paraoxonasetypen nach einem einfachen Zwei-Allele-Modell, ist der Paraoxonasetyp des Kindes aber 2 - 1.

Dies hat zum Beispiel zur Folge, daß der geschätzte Mittelwert der Gruppe mit mittlerer Cholinesterase-Restaktivität und damit des Paraoxonasetyps 2 - 1 etwas kleiner wird. Entsprechend diesem Beispiel wurden durch die Konstellationen der Familienwerte die Parameter der drei Gruppen in jedem Iterationsschritt verändert.

Analoge Überlegungen gelten auch für Familien, in denen ein Elternteil und das Kind mit hoher Wahrscheinlichkeit einem bestimmten Paraoxonasetyp zuzuordnen waren, nicht dagegen der andere Elternteil.

Das scheint umso mehr berechtigt, als wir in Fällen von fraglicher Vaterschaft in unserem System stets die üblichen

serologischen Untersuchungen durchführten und auch die Wahrscheinlichkeit der Vaterschaft nach Essen-Möller berücksichtigten.

Diese Untersuchungen sprachen in allen Fällen dafür, daß es sich um den wirklichen Vater handelte.

Aus dem Trennungsverfahren ergaben sich die in Tabelle 6 (s. S. 44) aufgeführten Schätzwerte und 5 %-Konfidenzintervalle für die prozentuale Verteilung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), und damit der drei Paraoxonasetypen in der Bevölkerung.

Die Konfidenzbereiche sind nicht größer als die in den Geigy-Tabellen für die Binomialverteilung angegebenen.

Tabelle 6

Schätzwerte und 5 %-Konfidenzintervalle für die prozentuale Verteilung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), und damit der drei Paraoxonasetypen in der Bevölkerung. (Festlegung der Bezeichnung s. Tabelle 2, S. 14.)

Paraoxonase- typ	prozentuale Verteilung	5 %-Konfidenz- intervalle
1 - 1	57,9	[54,43; 61,39]
2 - 1	36,1	[32,77; 39,54]
2 - 2	6,0	[4,42; 7,84]

Für 601 Werte der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}\text{M}$), wurden die Wahrscheinlichkeiten der Zugehörigkeit zu den drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität und damit zu den drei Paraoxonasetypen berechnet.

Daraus wurden für verschiedene Altersgruppen, die verschiedenen Blutgruppen und das Geschlecht jeweils durch Addition der entsprechenden Einzelwerte, die Wahrscheinlichkeiten der Zugehörigkeit zu den drei Gruppen errechnet und Kontingenztafeln erstellt.

Damit wurden die Prüfungen auf Zusammenhänge zwischen Gruppenzugehörigkeit der Cholinesterase-Restaktivität einerseits, und Alter, Geschlecht und Blutgruppen des ABO-Systems und des Dd-Systems andererseits durchgeführt.

Das Trennungsverfahren lieferte weiterhin die in Abb. 4, S. 39 dargestellten Verteilungskurven.

Abb. 4 zeigte zunächst das Histogramm von 799 logistisch transformierten Werten der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}\text{M}$) als Mischverteilung aus drei Normalverteilungen.

Die Trennung dieser Mischverteilung nach Hommel (1976), ergab die in Abb. 4 dargestellten Kurven der drei Normal-

verteilungen. Diese Normalverteilungen sind Ausdruck der Verteilung der drei Paraoxonasetypen.

Die Mischverteilung (Abb. 4) ist die Summe der Dichtefunktionen der drei Normalverteilungen, multipliziert mit den entsprechenden Häufigkeiten.

Die Fläche unterhalb des Graphen dieser Mischdichtefunktion muß gleich 1 = 100 % sein.

Abb. 3 (S. 38) zeigte zunächst die Häufigkeitsverteilung der ursprünglichen Cholinesterase-Restaktivitätswerte.

In Abb. 3 sind weiter die Kurven der Verteilung der drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) dargestellt.

Diese Kurven ergaben sich aus den drei Normalverteilungskurven der logistisch transformierten Werte (Abb. 4, S. 39) nach Umkehrung der logistischen Transformation.

Die Mischverteilung ist wiederum als Summe der Dichtefunktionen der drei Verteilungen, multipliziert mit den entsprechenden Häufigkeiten zu verstehen.

Die Fläche unterhalb des Graphen dieser Mischdichtefunktion muß wieder gleich 1 = 100 % sein.

Es handelt sich hierbei um keine Normalverteilungen, wie wir schon festgestellt haben (s. S. 38).

Die Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), entspricht in etwa der Verteilung der Paraoxonaseaktivität, wie der Vergleich der entsprechenden Histogramme (Abb. 1, S. 12 und Abb. 3, S. 38) zeigt.

Der prozentuale Anteil der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) und der Paraoxonase-Aktivität dürfte ungefähr gleich sein.

Es ergibt sich somit die Möglichkeit, durch Messung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung des Serums mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), Rückschlüsse auf den Paraoxonasetyp zu ziehen.

Ein exakter Vergleich zwischen den von uns gefundenen Verteilungen von Cholinesterase-Restaktivität und Paraoxonaseaktivität ist allerdings nicht möglich.

Dazu müßte man die durch direkte Messung der Paraoxonase-Aktivität und nach der Anti-CHE-Technik (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1969) gewonnenen Werte unter den gleichen Bedingungen aufarbeiten, wie z.B. hier für die Werte der Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), geschehen.

Noch besser müßten jeweils die gleichen Probanden nach der Anti-CHE-Technik und nach der Methode von Krisch (1968)

zur Untersuchung gelangen.

6.5.

Einfluß des Alters auf die Gruppenzugehörigkeit der
Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Pa-
raoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$)

Nach Richterich (1973) ist die Serumcholinesterase etwa vom 3. Lebensmonat an bis ins hohe Alter konstant.

Geschlechtsunterschiede wurden nicht beobachtet.

Um einen möglichen Einfluß des Alters auf die Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) festzustellen, wurde die einfache lineare Regression berechnet. Sie ergab bei 595 ausgewerteten Fällen einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,0035$. Das heißt, wenn überhaupt eine Abhängigkeit besteht, ist sie verschwindend gering.

Für den Chi-Quadrat-Test wurde die in Tabelle 7 (S. 49) aufgeführte Aufteilung der Altersklassen in ungefähre Quartile vorgenommen.

Tabelle 7

Aufteilung der Altersklassen von 595 Personen in ungefähre Quartile

Altersklassen	17 - 23	24 - 28	29 - 38	39 - 81
(Jahre)				
Anzahl der	147	153	147	148
Fälle				

Auch der Chi-Quadrat-Test für die Abhängigkeit des Alters und der Gruppenzugehörigkeit der Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), ergab keine signifikante Abhängigkeit.

(Chi-Quadrat-Wert = 2,76; Zahl der Freiheitsgrade = 6)

6.6.

Einfluß des Geschlechts auf die Cholinesterase-Rest-
aktivität, nach Vergiftung mit Paraaxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$)

Es wurde untersucht, ob zwischen den Werten der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität nach Vergiftung mit Paraaxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$), von 425 Männern und 374 Frauen Unterschiede bestehen. Der Wilcoxon-Test (Walter, 1975), zum Vergleich zweier unverbundener Stichproben wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Werte der beiden Geschlechter sich signifikant unterscheiden. Im Mittel lagen zwar die Werte der Frauen über denen der Männer, der Unterschied war aber nicht auffällig. Der Wert der normalverteilten Prüfgröße war gleich -0,65.

Der Chi-Quadrat-Test für die Abhängigkeit des Geschlechts und der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraaxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$), war bei einer Einteilung in 11 ungefähr gleich stark besetzte Klassen nicht signifikant. (Chi-Quadrat-Wert = 10,90; Zahl der Freiheitsgrade = 10)

Es wurden weitere Kontingenztafeln erstellt, um die Verteilung von Frauen und Männern auf die drei Gruppen ver-

schieden hoher Cholinesterase-Restaktivität zu untersuchen. Hier war der Chi-Quadrat-Test für die Abhängigkeit des Geschlechts und der Gruppenzugehörigkeit der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Para-oxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) signifikant.

(Chi-Quadrat-Wert = 7,26; Zahl der Freiheitsgrade = 2)

Die Überschreitungswahrscheinlichkeit p liegt bei 2,5 %, das heißt ein solches Ergebnis tritt in einem von 40 Fällen zufällig auf, wenn in Wirklichkeit kein Unterschied besteht. Krisch (1968) stellte fest, daß der Mittelwert seiner zweiten Gruppe (höhere Aktivitäten) bei den Frauen größer ist.

In Abbildung 5 ist die Verteilung der logistisch transformierten Werte der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), für 425 Männer (schwarze Säulen) und 374 Frauen (weiße Säulen) getrennt dargestellt.

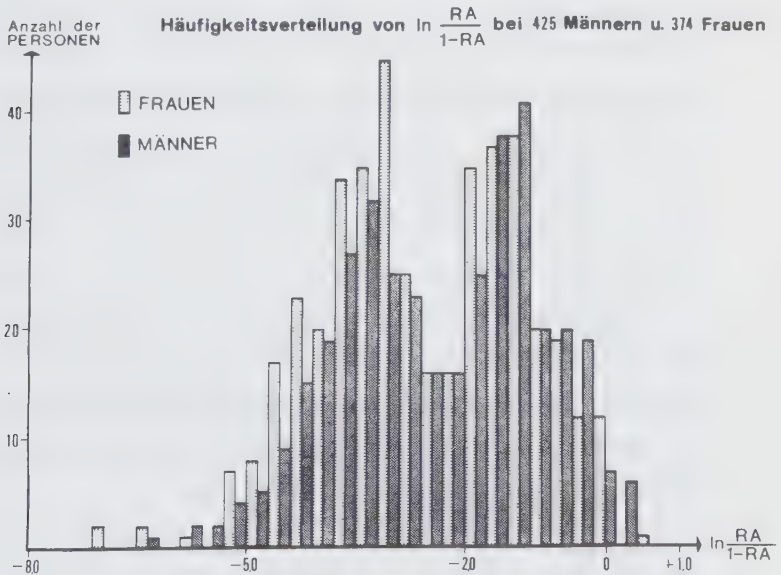
Die Abb. 5 zeigt, daß die Cholinesterase-Restaktivität der Frauen im Mittel höher ist, was schon der Wilcoxon-Test (Walter, 1975) ergab.

Außerdem ist der Anteil der Frauen an der mittleren und hohen Gruppe der Cholinesterase-Restaktivität relativ

Abbildung 5

Häufigkeitsverteilungen der logistisch transformierten Werte der Cholinesterase-Restaktivität, in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), von 425 Männern und 374 Frauen
(genaue Erklärung siehe Text)

RA = Cholinesterase-Restaktivität, nach Vergiftung mit
Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$)



größer als der Anteil der Männer. Dies wird besonders deutlich, wenn man berücksichtigt, daß die Werte von 425 Männern gegenüber den Werten von nur 374 Frauen ausgewertet wurden.

Damit im Einklang steht die signifikante Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit der Cholinesterase-Restaktivität vom Geschlecht.

Dennoch ist es unwahrscheinlich, daß eine genetische Kopplung des Paraoxonasetyps mit dem Geschlecht vorliegt. Der Vererbungstyp spricht für eine autosomale Vererbung. Die Geschlechtsabhängigkeit kann z.B. auf unterschiedlichen Enzymaktivitäten beruhen, die durch ein nicht ganz geschlechtsunabhängiges Moderatorgen beeinflußt werden.

6.7.

Zusammenhang zwischen den Blutgruppen des ABO-Systems und des Dd-Systems einerseits und der Zugehörigkeit eines Wertes der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) zu den drei Gruppen andererseits

In 301 Fällen waren von der Blutbank Erlangen die Blutgruppen bestimmt worden.

Die Blutgruppen des ABO-Systems sind in unserem Untersuchungsgut wie folgt verteilt:

O = 39 %, A = 43 %, B = 13 %, AB = 5 %.

Der Chi-Quadrat-Anpassungstest für die Verteilung der Blutgruppen der Bevölkerung in Europa:

O = 46 %, A = 43 %, B = 8 %, AB = 3 % (Vorlaender, 1973)

und unsere Werte ergaben eine signifikante Abhängigkeit.
(Chi-Quadrat-Wert = 16,62; Zahl der Freiheitsgrade = 3)

Die Abweichungen vor allem in den Gruppen B und O können durch willkürliche Auswahl der Blutspender in der Blutbank Erlangen bedingt sein.

Der Chi-Quadrat-Test für die Abhängigkeit der Blutgruppen und der Gruppenzugehörigkeit der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), ergab keine signifikanten Werte.

Der Unterschied der Verteilung der Blutgruppen des ABO-Systems in unserem Untersuchungsgut zur Verteilung in

der Bevölkerung ist also für die vorliegenden Fragestellungen nicht von Bedeutung.

(Chi-Quadrat-Wert für das Dd-System = 3,07; Zahl der Freiheitsgrade = 2, Chi-Quadrat-Wert für das ABO-System = 7,10; Zahl der Freiheitsgrade = 6)

Die Verteilung der Rhesusfaktoren bei weißen Menschen (Rh = 85 %, rh = 15 %) stimmt gut mit unseren Ergebnissen überein: Rh = 84 %, rh = 16 %.

Der Chi-Quadrat-Anpassungstest war unauffällig.

(Chi-Quadrat-Wert = 0,23; Zahl der Freiheitsgrade = 2)

6.8.

Gültigkeit der Hardy-Weinberg-Regel für die Verteilung der drei Paraoxonasetypen

Die Hardy-Weinberg-Regel besagt, daß sich bei einer Genhäufigkeit zweier Allele von $A_1 = p$ und $A_2 = q$; ($p + q = 1$) in der ersten Generation der Panmixie bei autosomalem Erbgang ein Verhältnis der Genotypen A_1A_1 , A_1A_2 und A_2A_2 von $p^2 : 2pq : q^2$ herstellt und in allen folgenden Generationen erhalten bleibt.

Zur Berechnung der theoretischen Häufigkeit der drei Paraoxonase-Typen mußte die Häufigkeit p des ersten Gens

geschätzt werden ($\hat{p} = 0,7595$; d.f. $\hat{q} = 0,2405$). Nach Cramér (1946) wird beim Chi-Quadrat-Anpassungstest hierbei nur ein Freiheitsgrad zugrundegelegt.

Die geschätzten Häufigkeiten der drei Paraoxonasetypen wurden auf Übereinstimmung mit den beobachteten Häufigkeiten geprüft. Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Anpassungstestes war in keiner Weise auffällig, das heißt, die Verteilung der drei Paraoxonasetypen stimmt sehr gut mit der Hardy-Weinberg-Regel überein.

(Chi-Quadrat-Wert = 0,11; Zahl der Freiheitsgrade = 1)

6.9.

Wahrscheinlichkeitsaussagen für den Paraoxonasetyp für individuelle Werte der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$)

Wenn die Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$) gemessen ist, kann nach der Formel für die bedingten Wahrscheinlichkeiten die Wahrscheinlichkeit p der Zugehörigkeit zum Paraoxonasetyp i errechnet werden:

$$p(\text{Gr. } i) = \frac{\frac{q_i}{s_i} \cdot \exp\left(-\frac{(x - \bar{x}_i)^2}{2s_i}\right)}{\sum_{j=1}^3 \frac{q_j}{s_j} \cdot \exp\left(-\frac{(x - \bar{x}_j)^2}{2s_j}\right)}$$

Dabei ist $x = \ln\left(\frac{RA}{1-RA}\right)$

RA = Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$).

q_j = Häufigkeiten der drei Gruppen.

$\bar{x}_j$ = Mittelwerte der drei Gruppen im logistisch transformierten Maßstab.

s_j^2 = Varianzen der drei Gruppen im logistisch transformierten Maßstab.

In Tabelle 8 sind die Häufigkeiten q_j , die Mittelwerte $\bar{x}_j$ und die Varianzen s_j^2 für die drei Gruppen angegeben. Es handelt sich dabei um die geschätzten Werte aufgrund der vorliegenden Stichprobe.

Tabelle 8

Häufigkeiten, Mittelwerte und Varianzen für die drei Paraoxonasetypen (Festlegung der Bezeichnung siehe Tabelle 2, S. 14).

Paraoxonasetyp	1 - 1	2 - 1	2 - 2
Häufigkeiten q_j	0,57	0,36	0,06
Mittelwerte $\bar{x}_j$	-3,39	-1,32	-0,20
Varianzen s_j^2	0,92	0,24	0,08

7. Ergebnisdiskussion

Nach Vergiftung des Serums von 50 nicht verwandten Personen mit E 600 in $3,2 \cdot 10^{-8}$ molarer Konzentration, fanden Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1969) unterschiedlich hohe Cholinesterase-Restaktivitäten, wobei eine Aufteilung der Restaktivitäten, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivitäten, in eine niedrige, mittlere und hohe Gruppe möglich war.

Weitere Untersuchungen von Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1972) ergaben eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 und der Aktivität der E 600 spaltenden Paraoxonase, gemessen nach Krisch (1968).

Es zeigte sich dabei, daß sich bei hoher Paraoxonase-Aktivität auch eine hohe Cholinesterase-Restaktivität ergab. Damit war die Möglichkeit geschaffen, die verbleibende E 600-Konzentration und damit die entsprechende Paraoxonase-Aktivität über die jeweilige Cholinesterase-Restaktivität experimentell genau darzustellen.

Untersuchungen von Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1973) an 35 Familien mit 52 Kindern führten zu dem Schluß, daß der festgestellte Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase möglicherweise genetisch determiniert ist und

einem einfachen Zwei-Allele-Modell folgt.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun die Untersuchungsergebnisse von 601 Einzelpersonen und 99 Familien mit 180 Kindern statistisch ausgewertet.

Das Histogramm (Abb. 3, S. 38) von 799 Werten der Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$), bestätigte erneut die Einteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität.

Diese Einteilung in drei Gruppen wird vor allem durch die Untersuchungsergebnisse von 99 Familien mit 180 Kindern deutlich, die ausnahmslos einer Vererbung der drei Paraaxonasetypen nach dem Zwei-Allele-Modell entsprachen. Die Werte innerhalb der drei Gruppen sind allerdings nicht normalverteilt.

Die Werte der Cholinesterase-Restaktivität wurden deshalb logistisch transformiert (Koller, 1955), (Abb. 4, S. 39). Jetzt konnten wir Normalverteilung innerhalb der drei Gruppen annehmen.

Unter dieser Voraussetzung wurde die Mischverteilung aus den drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$)

durch ein Iterationsverfahren getrennt (Hommel, 1976), (Abb. 4, S. 39), wobei die Konstellationen der Familienwerte unter der Annahme einer Vererbung der drei Paraoxonasetypen nach einem einfachen Zwei-Allele-Modell als stochastisches Außenkriterium dienten.

Aus dem Iterationsverfahren ergaben sich für die Paraoxonasetypen 1 - 1, 2 - 1 und 2 - 2 (Festlegung der Bezeichnung siehe Tabelle 2, S. 14) die Schätzwerte 57,9 %, 36,1 % und 6,0 % für die prozentuale Verteilung in der Bevölkerung.

Diese Verteilung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$) und damit der drei Paraoxonasetypen, stimmt sehr gut mit der Hardy-Weinberg-Regel überein.

Das spricht für eine Vererbung der drei Paraoxonasetypen nach dem Zwei-Allele-Modell und dafür, daß die drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}M$) den drei Paraoxonasetypen bisher richtig zugeordnet wurden.

Auch bei der Auswertung von Untersuchungen über die Paraoxonase-Aktivität an 180 Probanden nach der spektrophotometrischen Methode von Krisch (1968) fanden wir eine Mischverteilung von drei Verteilungen (Abb. 1, S. 12).

Die Verteilung der Paraoxonase-Aktivität, die Zech und Zürcher (1974) fanden, stimmt sehr gut damit überein (Abb. 1, S. 12). Das optische Bild dieser Verteilungen kann man als Mischverteilung aus drei Normalverteilungen deuten. Zech und Zürcher (1974) deuteten das Ergebnis ihrer Untersuchungen allerdings als bimodale Verteilung. Die Verteilung der Paraoxonase-Aktivität ist auch der Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) ähnlich (Abb. 1, S. 12 und Abb. 3, S. 38). Der prozentuale Anteil der drei Gruppen verschieden hoher Paraoxonase-Aktivität und Cholinesterase-Restaktivität dürfte ungefähr gleich sein. Ein exakter Vergleich zwischen der Verteilung von Paraoxonase-Aktivität und Cholinesterase-Restaktivität ist allerdings nicht möglich.

Dazu müßte man die durch direkte Messung der Paraoxonase-Aktivität gewonnenen Werte unter den gleichen Bedingungen aufarbeiten, wie z.B. hier nach der Anti-CHE-Technik (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1969) geschehen. Noch besser müßten jeweils die gleichen Probanden nach der Anti-CHE-Technik und nach der Methode von Krisch (1968) zur Untersuchung gelangen.

Bei der nochmaligen Auswertung entsprechender Versuchsergebnisse von 50 Probanden (Baumgartner, 1970), bestätigte sich erneut die hochsignifikante Korrelation zwischen Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) und Paraoxonase-Aktivität ($r = +0,80$). Es ergibt sich somit die Möglichkeit durch Messung der Cholinesterase-Restaktivität den Paraoxonasetyp zu bestimmen.

Unter Verwendung der Ergebnisse des Trennungsverfahrens (Hommel, 1976) kann man für individuelle Werte der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zu den drei Paraoxonasetypen angeben.

Wegen der sich überschneidenden Bereiche erscheint es sinnvoller, Wahrscheinlichkeitsaussagen bezüglich der Zuordnung zu den drei Paraoxonasetypen zu machen.

In Analogie zu den Ergebnissen von Krisch (1968) fanden wir eine signifikante Abhängigkeit der Zuordnung der Cholinesterase-Restaktivität zu den drei Gruppen vom Geschlecht. Die Werte der Frauen waren im Mittel höher als die Werte der Männer. Der Anteil der Frauen an der

zweiten und dritten Gruppe ist relativ größer als der Anteil der Männer (Abb. 5, S. 51).

Ein Einfluß des Alters auf die Gruppenzugehörigkeit der Cholinesterase-Restaktivität konnte nicht festgestellt werden.

Auch zwischen den Blutgruppen (ABO- und Dd-System) und der Cholinesterase-Ausgangsaktivität einerseits und der Gruppenzugehörigkeit der Cholinesterase-Restaktivität andererseits, konnten wir keinen Zusammenhang finden.

8. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse über die Serumcholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$).

Als Untersuchungsmaterial hatten menschliche Seren von 601 Einzelpersonen und von 99 Familien mit 180 Kindern gedient.

Es bestätigte sich erneut, daß man die Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Aktivität einteilen kann. Auch die direkt nach Krisch (1968) gemessene Paraoxonase-Aktivität des menschlichen Serums zeigt eine Mischverteilung von drei Verteilungen und entspricht in etwa der Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$). Eine Einteilung in drei Gruppen ist auch deshalb nahelegend, weil die Ergebnisse der Familienuntersuchungen eindeutig auf eine Vererbung der Paraoxonasetypen nach einem einfachen Zwei-Allele-Modell hinweisen.

Die Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Para-

oxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) ist hochkorreliert mit der Paraoxonase-Aktivität des menschlichen Serums.

Die Paraoxonase-Aktivität kann also über die jeweilige Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) experimentell dargestellt werden.

Die Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität stellt sich als Mischverteilung dar, und es ist in den Überlappungsbereichen nicht möglich, die drei Gruppen exakt zu trennen.

Eine Trennung der Mischverteilung war durch die Konstellationen der Familienwerte, die als stochastisches Außenkriterium dienten, möglich. Dieses Verfahren (Hommel, 1976) ermöglichte es, Schätzwerte für die Verteilung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität und damit der drei Paraoxonasetypen und Wahrscheinlichkeiten der Zugehörigkeit individueller Werte der Cholinesterase-Restaktivität zu den drei Paraoxonasetypen anzugeben.

Die Verteilung der drei Paraoxonasetypen stimmt sehr gut mit der Hardy-Weinberg-Regel überein. Das spricht für eine Vererbung der drei Paraoxonasetypen nach einem einfachen Zwei-Allele-Modell.

Es ist unwahrscheinlich, daß der festgestellte Einfluß des Geschlechts auf die Gruppenzugehörigkeit der Cholinesterase-Restaktivität durch geschlechtsgebundene Vererbung der Paraoxonasetypen bedingt ist.

Aufgrund des umfangreichen Untersuchungsgutes und der Ergebnisse der statistischen Auswertung, kann man davon ausgehen, daß es drei verschiedene Typen der menschlichen Serumparaoxonase gibt, die nach einem einfachen Zwei-Allele-Modell vererbt werden.

Die Bestimmung des Paraoxonasetyps über die Cholinesterase-Restaktivität, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität, nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$), ist mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit möglich, für die eine Formel angegeben wird.

Durch Kombination von Anti-CHE-Technik (Geldmacher-v.Mallinckrodt et al., 1969) und direkter spektrophotometrischer Methode nach Krisch (1968) läßt sich höchstwahrscheinlich eine bessere Trennung der drei Gruppen verschieden hoher Cholinesterase-Restaktivität, bzw. Paraoxonase-Aktivität erzielen, da in diesem Fall zweidimensionale Verteilungen zu trennen wären.

Um die Ergebnisse unserer Untersuchungen noch mehr abzusichern, wären also weitere umfangreiche Familienuntersuchungen und deren statistische Auswertung erforderlich.

Ein weiterer Beitrag zur Klärung des Problems wäre die Isolierung und Reindarstellung der Enzymproteine der drei Paraoxonasetypen.

9. Literaturverzeichnis

AICHINGER, W.:

Untersuchungen über die Cholinesterase-Restaktivität menschlicher Seren bei Vergiftungen mit E 600. Untersuchungen an 57 weiblichen Probanden.

Dissertation, Erlangen 1976

ALDRIDGE, W.N.:

Serumesterases. 1. Two types of esterases (A und B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, proprionate and butyrate, and a method for their determination.

Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

ALDRIDGE, W.N.:

Serumesterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.

Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

AMMON, R.:

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)

AUGUSTINSSON, K.-B.:

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds. IV.
Specifity studies. Acta chem. scand. 8, 1533 (1954)

AUGUSTINSSON, K.-B., HEIMBÜRGER, G.:

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
Biochim. bipohys. Acta (Amst.) 13, 303 (1954)

AUGUSTINSSON, K.-B., HEIMBÜRGER, G.:

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds.
V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactivation
of cholinesterases by organophosphorus compounds in
vitro. Acta chem. scand. 9, 310 (1955)

BARTEL, M.:

Dissertation, Erlangen, in Vorbereitung

BAUMGARTNER, W.:

Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen fermen-
tativem E 600-Abbau und Vergiftung der Cholinesterase
durch E 600 im menschlichen Serum.
Dissertation, Erlangen, 1970

BEHRINGER, K.:

Dissertation, Erlangen, in Vorbereitung

BRAUNMILLER, F.:

Untersuchungen über eine genetische Kopplung zwischen
der Paraoxonase-Aktivität im Serum und dem Faktor
"Rhesus-pos." (D) an 153 Versuchspersonen.

Dissertation, Erlangen, 1975

BURGIS, H.-J.:

Untersuchungen über den fermentativen Abbau von E 600,
Methyl-E 600, E 605 und Methyl-E 605 im menschlichen
Serum.

Dissertation, Erlangen, 1972

CRAMER, H.:

Mathematical Methods and Statistics. § 30,3:

Princeton University Press, Princeton 1946

DIETRICH, H.G.:

Dissertation, Erlangen, in Vorbereitung

DIETZEL, B.:

Untersuchungen über den fermentativen Abbau von E 600,
Monomethyl-E 600 und p-Nitrophenylphosphat im mensch-
lichen Serum.

Dissertation, Erlangen, 1974

ECKSTEIN, H.:

Dissertation, Erlangen, in Vorbereitung

FISCHER, T.:

Erste Untersuchungen zur Geschlechts- und Alters-
abhängigkeit der menschlichen Serum-Cholinesterase-
restaktivität nach Vergiftung mit E 600 (O,O-Diäthyl-
O-(p-nitrophenyl)-phosphat) für eine Gruppe süd-
deutscher Probanden.

Dissertation, Erlangen, 1975

FLÜGEL, M.:

persönliche Mitteilung

FRIEDBERG, K.D., SAKAI, F.:

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methjodid, PAM). Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

FRIEDBERG, K.D., ERDMANN, W.D.:

Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate (Paraaxon, Systox, Isosystox) blockierten Cholinesterase in vitro. Arch. exp. Path. Pharmacol. 237, 1 (1959)

GEBHARD, W.:

Dissertation, Erlangen, in Vorbereitung

GELDMACHER-V. MALLINCKRODT, M., RABAST, U., LINDORF, H.H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat). Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

GELDMACHER-V. MALLINCKRODT, M., BAUMGARTNER, W.,
PETENYI, M., BURGIS, H., LINDORF, H.H., METZNER, H.:
Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergift-
barkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der
Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-Systems in
menschlichen Seren. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.
353, 217 (1972)

GELDMACHER-V. MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.H.,
PETENYI, M., FLÜGEL, M., FISCHER, T., HILLER, T.:
Genetisch determinierter Polymorphismus der mensch-
lichen Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2). Humangenetik
17, 331 (1973)

GÖBEL, M.:

Dissertation, Erlangen, in Vorbereitung

GOEDDE, H.W., DOENICKE, A., ALTLAND, K.:

Pseudocholinesterasen. Berlin-Heidelberg-New York:

Springer 1967

HEATH, D.F.:

Organophosphorus poisons

Pergamon, Oxford, London, New York, Paris (1961)

HILLER, T.A.:

Beitrag zur Verteilung der Paraoxonase-Typen des menschlichen Serums in Mittelfranken.

Dissertation, Erlangen, 1975

HOMMEL, G.:

Trennung von Mischverteilungen durch ein stochastisches Außenkriterium. Vortrag auf der Tagung über Mathematische Methoden in der Medizin in Oberwolfach, 1.3. - 5.3.1976

V. HORN, R.:

Untersuchungen über eine genetische Koppelung zwischen der Serumparaoxonase-Aktivität und der Blutgruppe O bei 92 Versuchspersonen.

Dissertation, Erlangen, 1975

IUPAC-IUB-Commission on Biochemical Nomenclature (CBN):

Nomenklatur multipler Enzymformen, Empfehlungen 1971.

Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 353, 852 (1972)

KOLLER, S.:

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse in:
Lang, K., und Lenartz, E., Hrgb.: Handbuch der physio-
logisch- und pathologisch-chemischen Analyse Bd. II,
S. 931. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1955)

KRISCH, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat
durch menschliches Serum. Z. klin. Chem. klin. Biochem.
6, 41 (1968)

KRISCH, K.:

persönliche Mitteilung

MAIN, A.R.:

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitro-
phenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum. Biochem. J. 74,
10 (1960)

MARQUART, J.:

Untersuchungen über die Cholinesterase-Restaktivität von
50 menschlichen Seren bei Vergiftung mit E 600 unter Ver-
wendung von Butyrylcholinjodid als Substrat
Dissertation, Erlangen, 1973

MEGERLE, U.:

Vergleichende Untersuchungen zur optimalen Bestimmung der Paraoxonasetyphen im menschlichen Serum mit verschiedenen Substraten.

Dissertation, Erlangen, 1975

METZNER, H.:

Vergleichende Untersuchung zur Hydrolyse von E 600, Chlorthion und P=O Chlorthion durch menschliche Serumenzyme.

Dissertation, Erlangen, 1973

MOUNTER, L.A.:

Some studies of enzymatic effects of rabbit serum. J. biol. Chem. 209, 813 (1954)

MÜLLER, P.U.:

Untersuchungen über die Genetik der unterschiedlichen Vergiftbarkeit menschlicher Serum-Cholinesterase mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat).

Dissertation, Erlangen, 1975

NIRSCHL, H.:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase

Versuche mit m-, o- und p-Nitro-E 600.

Dissertation, Erlangen, 1972

ORTLIEB, R.:

Dissertation, Erlangen, in Vorbereitung

PECHMANN, A.:

Untersuchungen über die Cholinesteraseaktivität menschlicher Seren bei Vergiftung mit E 600 - Untersuchungen an 45 männlichen Probanden.

Dissertation, Erlangen, 1976

RENNER, O.:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonasen

Versuche mit Paraoxon, n-propyl-Paraoxon und iso-propyl-Paraoxon.

Dissertation, Erlangen, 1973

RICHTERICH, R.:

Enzymstoffwechsel in: Siegenthaler, W.: Klinische Pathophysiologie S. 169, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1973

RIEMANN, T.:

Dissertation, Erlangen, in Vorbereitung

ROSIVAL, L., VROBOVSKY, L., SELECKY, F.V.:

Toxikologia a farmakobiodynamika organofosforovych
zlucenin

Bratislava Vydavatel stvo Slovenskej akademie vied (1959)

Zit. nach Lorke, D. und Kimmerle, G. (1968)

SCHAUMANN, W., SCHILLER, M.:

Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und im Serum.

Arch. exp. Path. Pharmacol. 239, 114 (1960)

SCHMITT, R.J.R.:

Untersuchungen über die Vererbbarkeit der menschlichen
Serum-Paraoxonase.

Dissertation, Erlangen, 1975

SCHRAMM, G.:

Dissertation, Erlangen, in Vorbereitung

SCHWARZFISCHER, A.:

Untersuchungen zur Korrelation der Cholinesterase-Ausgangsaktivität des menschlichen Serums und der Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat).

Dissertation, Erlangen, 1975

STEPHAN, M.:

Untersuchungen zur optimalen Bestimmung der Paraoxonase-Typen im menschlichen Serum.

Dissertation, Erlangen, 1973

SÜLLMANN, E.:

Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebestoffwechsels

in: Lang, K. und Lehnartz, E. Hrgb.:

Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Bd. IV, Teil a: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1964)

VICTOR, N., HÖRMANN, A., EDER, L.:

Statsys, Beschreibung und Anleitung zur Benutzung der Programme unter dem Betriebssystem BSV der Siemens 4004/46, GSF-Bericht MD 24. München: Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH 1973

VORLAENDER, K.O.:

in: Isoimmunphänomene, Siegenthaler, W.: Klinische Pathophysiologie S. 464. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1973

WALTER, E.:

Biomathematik für Mediziner
B.G. Teubner, Stuttgart 1975

WESTERNACHER, J.:

Untersuchungen über eine Korrelation der Cholinesterase Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 mit dem Alter bei 92 Personen.
Dissertation, Erlangen, 1975

ZECH, R., ZÜRCHER, K.:

Organophosphate splitting serum enzymes in different mammals. Comp. Biochem. Physiol. (B) 48, 427, 1974

ZIMMER, R.:

Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen der Paraoxonase-Aktivität des menschlichen Serums und der Blutgruppe A.

Dissertation, Erlangen, 1975

An dieser Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, ihre außergewöhnlich große Hilfsbereitschaft und den zu jeder Zeit so freundlich erteilten Rat recht herzlich danken.

Herr Dr. G. Hommel hat mir bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse sehr geholfen. Ich möchte ihm dafür meinen Dank sagen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. L. Horbach, Vorstand des Institutes für Medizinische Statistik und Dokumentation für die freundliche Durchsicht meiner Arbeit und die vielen wertvollen Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling, Vorstand des Institutes für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Opitz bin ich für die Hilfe bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse meiner Arbeit sehr verbunden.

Lebenslauf

Personalien:

Josef Dumbach

geb. 10. Januar 1950 in Körbeldorf

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Valentin Dumbach, Beamter

Anna Dumbach, geb. Neukam

Ausbildung:

1956-1960 Volksschule in Körbeldorf

1960-1969 Gymnasium in Pegnitz

1969 Abitur

1969-1970 Wehrpflicht im Sanitätsdienst
der Bundeswehr

SS 1970-

SS 1975 Studium der Zahnmedizin an der
Universität Erlangen-Nürnberg

19.9.1972 Zahnärztliche Vorprüfung

18.6.1975 Zahnärztliche Prüfung

26.6.1975 Bestallung als Zahnarzt

7.7.1975 Promotion zum Dr. med. dent.

SS 1971 -

z. Zt. Studium der Medizin an der Uni-
versität Erlangen-Nürnberg

9.10.1973 Ärztliche Vorprüfung

16.12.1976 Ärztliche Prüfung

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197